

## 経皮免疫法によるアレルギー免疫療法の開発

分担研究者 内藤 誠之郎 国立感染症研究所 検定検査品質保証室 主任研究官

### 研究要旨

経皮免疫法は、皮膚の表面に抗原を投与することによって免疫応答を誘導する、注射に依らない免疫法である。この方法を減感作療法に応用すれば、簡便で安全な方法を開発できる可能性がある。本研究では、マウスを用いて経皮免疫の種々の条件を検討し、安全で効果的な経皮免疫法を確立するための基礎的データを得た。抗原を含んだパッチの皮膚への貼付時間を長くするとそれに連れて血清中の抗原特異的抗体応答は増強された。16時間以上の貼付では、コレラ毒素などの毒性の強いアジュバントを使用しなくても有意な抗体応答を誘導できた。また、免疫する皮膚の部位により抗体応答の強度はかなり異なっていた。テープストリッピングにより角質層を除去すると、経皮免疫応答は顕著に増強された。また、角質層の浸透性を促進することが知られているエタノールやオレイン酸で皮膚を前処理することにより、経皮免疫効果は改善された。以上のことから、経皮免疫条件を工夫して最適化することにより、より安全で効果的な経皮免疫法を開発することが可能であり、減感作療法に応用できる可能性も高いと考えられた。

### A. 研究目的

経皮免疫法は、皮膚の表面に抗原を投与することによって動物に抗原特異的な免疫応答を誘導する、注射に依らない免疫法である。経皮免疫法を、アレルギー免疫療法における抗原投与法に適用できれば、簡便で安全な方法として有用性の高い方法になる可能性がある。しかし、一般に正常な皮膚は抗原のような高分子物質の通過を阻止するバリアー機能を有しており、これが経皮免疫法の効果を制限する要因の一つと考えられる。そこで、本研究では、安全で効果的な経皮免疫法を確立するための基礎的データを得ることを目的に、抗原の皮膚送達を促進法など、種々の免疫条件を検討した。

### B. 研究方法

#### 1. 動物

初回免疫の時点で6～8週令のメスのC57BL/6マウス(日本SLC、浜松)を用いた。

#### 2. 試薬

抗原として卵白アルブミン(OVA)、アジュバントとしてコレラ毒素(CT)(シグマ、セントルイス、米国)を用いた。オレイン酸は和光純薬工業(大阪)より購入した。

#### 3. 経皮免疫の方法

マウスの腹部または耳介の皮膚に抗原溶液を含ませたガーゼパッチ(メディパッチ®; 白十字、東京)を貼付してテープで固定した(図1)。パッチの貼付は、ケタミンとキシラジンによる麻酔下で行なった。腹部の皮膚にパッチを貼る場合には、その2日前にバリ

カン (No.40) で腹部の被毛を、皮膚を傷つけないように慎重に刈った。免疫終了後にパッチを貼付していた皮膚部位を滅菌水でよく洗浄して、ペーパータオルで拭き取った。

#### 4. テープストリッピングの方法

セロテープ (ニチバン、東京) をマウスの皮膚に貼って、勢いよくはがす操作を 10 回繰り返した。セロテープは 1 回ごとに新しいテープを用いた。

#### 5. ELISA による血清中の抗原特異的 IgG 抗体価の測定

経皮免疫は 2 週間隔で 3 回実施した。初回免疫の 6 週後 (一部の実験では初回免疫の 4 週後) に血清を採取した (図 2)。抗原をコートした 96 穴プレート (MaxiSorp®; ヌンク、デンマーク) に段階希釈したマウスの血清を加えて 1 時間半放置した。3 回洗浄した後、酵素標識した抗マウス IgG 抗体 (ザイメット、米国) を加えて 1 時間半放置した。3 回洗浄した後、基質溶液を加え、プレートリーダーで吸光度を測定した。

#### 6. 倫理面への配慮

マウスを用いた実験は、国立感染症研究所動物実験委員会の承認 (承認番号: 207073) を得たのち、国立感染症研究所動物実験指針にしたがって実施した。

### C. 結果

#### 1. パッチ貼付時間の延長による抗体応答の増強

OVA を 100  $\mu$ g 含んだパッチをマウスの腹部に 2 時間から 16 時間貼付した。アジュバントとして CT を 10  $\mu$ g 加えたパッチを貼付

した場合には、2 時間の貼付で、血清中に有意な抗原特異的 IgG 抗体産生が観察された。一方、OVA 単独の免疫では、2 時間の貼付では有意な抗体産生は誘導されなかったが、16 時間の貼付では有意な抗体産生が観察された (図 3)。

#### 2. パッチを貼付する皮膚部位による抗体応答の違い

OVA を 10  $\mu$ g または 100  $\mu$ g 含んだパッチをマウスの腹部の皮膚または耳介の皮膚にそれぞれ 16 時間貼付して、免疫効果を比較した。腹部の皮膚よりも耳介の皮膚にパッチを貼付した方が強い抗原特異的 IgG 抗体の誘導が観察された (図 4)。

#### 3. テープストリッピングによる経皮免疫応答の促進

マウスの耳介の皮膚の角質層をテープストリッピングにより除去した後に、OVA を 10  $\mu$ g 含んだパッチを 16 時間貼付した。テープストリッピングを施すことにより、抗原特異的 IgG 抗体産生は顕著に増強された (図 5)。

#### 4. エタノールおよびオレイン酸前処理による経皮免疫応答の増強

マウスの耳介の皮膚を 70%エタノールまたは 70%エタノール+10%オレイン酸を含んだ脱脂綿で 20 回清拭した後に、OVA を 100  $\mu$ g 含んだパッチを 16 時間貼付した。前処理を施さなかった場合に比べて 70%エタノールで前処理することにより抗原特異的 IgG 抗体産生は増強され、前処理に 10%オレイン酸を加えることにより増強効果はさらに改善された (図 6)。

#### D. 考察

抗原を含んだパッチを皮膚に貼付する時間を長くするほど免疫応答は増強された。16時間の貼付ではアジュバントとしてCTを用いなくても有意な抗体産生が誘導された。これまでは、一般的に、有意な経皮免疫応答の誘導にはアジュバントの使用が不可欠と考えられて来たが、長時間のパッチ貼付を行なえば必ずしもアジュバントを使用しなくても経皮免疫が可能であることが明らかになった。このことは、CTのような毒性の強いアジュバントを使用しないで、より安全性の高い経皮免疫法を開発できる可能性があることを示している。

パッチを耳介に貼付した場合と腹部に貼付した場合とでは、免疫応答の強度は大きく異なった。このことは、経皮免疫を施す皮膚部位の選択が効果的な経皮免疫にとって重要であることを示している。このような皮膚部位による違いは角質層のバリアー機能の違いを反映しているのかもしれない。テープストリッピングによって角質層を除去することにより経皮免疫応答が顕著に増強されたことは、角質層のバリアー機能が経皮免疫の阻害要因として重要であることを示している。低分子量の経皮吸収薬では、エタノールやオレイン酸が角質層のバリアー機能を低下させることが報告されている。今回の実験によりこれらの物質は高分子量の抗原による経皮免疫に対しても有効であることが確認された。

以上のように、免疫条件を工夫することに

より経皮免疫応答を改善することができた。さらに検討を重ねて条件を最適化することにより、安全で簡便な減感作療法の投与ルートとして経皮免疫法を応用できる可能性があると考えられる。

#### E. 結論

抗原を含んだパッチの皮膚への貼付時間を長くすることにより免疫応答を増強することができる。16時間以上の貼付では、アジュバントを使用しなくても有意な抗体応答を誘導できた。免疫する皮膚の部位により経皮免疫の効果は異なる。テープストリッピングにより角質層を除去すると、経皮免疫の効果は顕著に改善される。また、角質層の浸透性を促進する薬剤で前処理することも、経皮免疫応答の増強に効果がある。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Naito S, Maeyama J, Mizukami T, Takahashi M, Hamaguchi I, Yamaguchi K. Transcutaneous immunization by merely prolonging the duration of antigen presence on the skin of mice induces a potent antigen-specific antibody response even in the absence of an adjuvant. *Vaccine* 2007; 25: 8762-8770.

##### 2. 学会発表

なし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

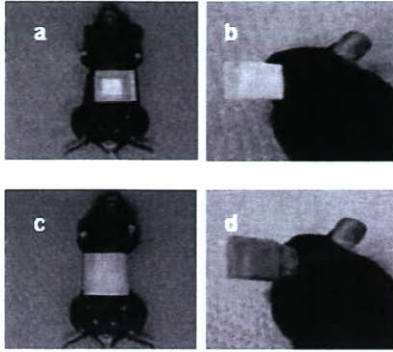


図1. 経皮免疫の方法

パッチを腹部または耳介に貼付して(a,b)テープで固定する(c,d)。

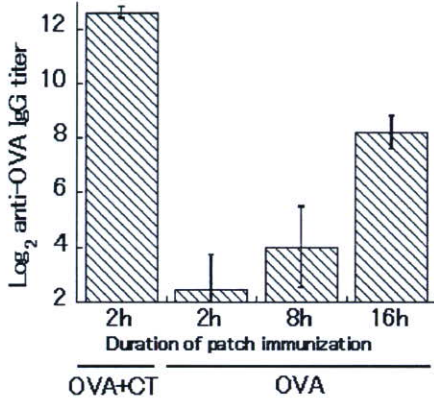


図3. パッチ貼付時間の延長による抗体応答の増強

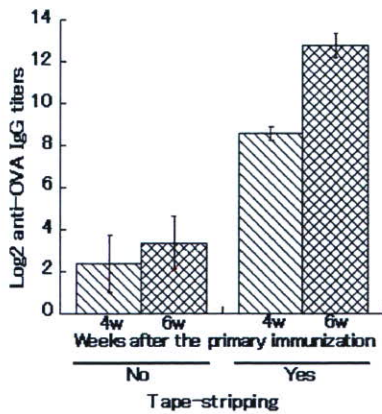


図5. テープストリッピングによる経皮免疫応答の促進

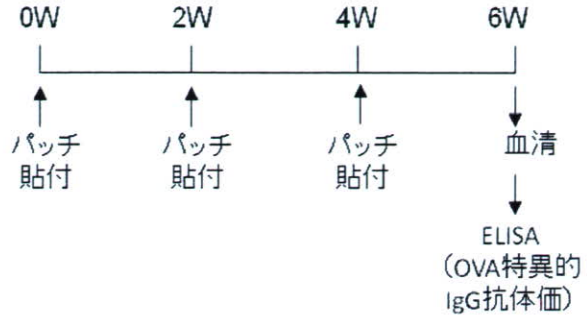


図2. 経皮免疫のスケジュール

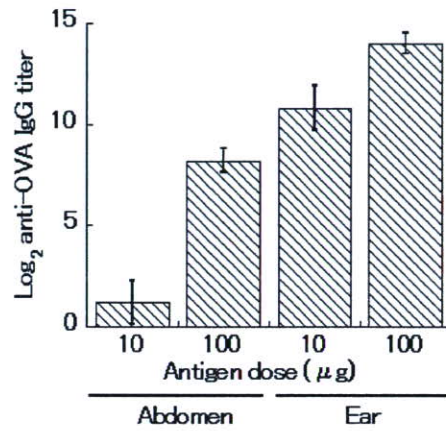


図4. パッチを貼付する皮膚部位による抗体応答の違い

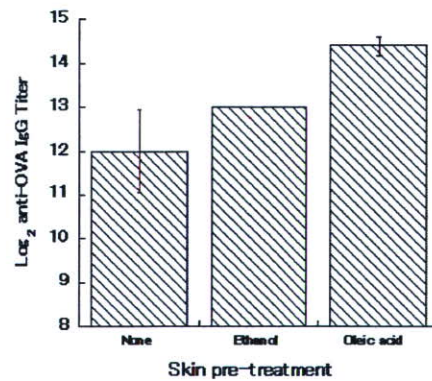


図6. エタノールおよびオレイン酸前処理による経皮免疫応答の増強

## 免疫療法におけるヒノキ花粉アレルゲンの必要性の検討

分担研究者 齋藤三郎 東京慈恵会医科大学 准教授

### 研究要旨

B10.S マウスでは、Cry j 1 と Cha o 1 に対する免疫反応は交叉する。Cry j 1 の経口投与は、Cry j 1 で誘導された Cry j 1 に対する免疫反応および Cha o 1 に対する交叉反応を抑制した。しかし、Cha o 1 で誘導した免疫反応は抑制できなかった。Cha o 1 特異的 T 細胞エピトープの存在が予想されたために、Cha o 1 で感作した B10.S、BALB/c および C57BL/6 マウスから、Cha o 1 特異的 T 細胞エピトープを同定した。さらに、花粉症患者においても Cry j 1 のヒト主要 T 細胞エピトープに相当する Cha o 1 のペプチド部分を用いて、Cha o 1 特異的エピトープが存在することを明らかにした。

### A. 研究目的

スギ花粉症の症状は、スギ花粉飛散の時期ばかりでなくヒノキ花粉飛散の時期にも増悪することが知られている。ヒノキ花粉の飛散量は近年増加しており、スギ花粉と同じくらい飛散する地域も観察されている。現在行なわれている減感作療法は、スギ花粉のエキスをを用いた免疫療法であり、今後増加が予想されるヒノキ花粉症に対して十分かどうか検討することは重要である。これまでの研究から、スギ花粉の主要なアレルゲン Cry j 1 とヒノキ花粉アレルゲン Cha o 1 の相同性は、アミノ酸レベルで 80% であり、ヒノキ花粉飛散時期に症状が増悪するのはこのためと推測されている。しかしながら、ヒノキ花粉アレルゲン特異的 T 細胞の存在も動物モデルでは見出されており、スギ・ヒノキ花粉症患者において、ヒノキ花粉アレルゲンとスギ花粉アレルゲンに交差するあるいはそれぞれに特異的 T 細胞が存在するのか、T 細胞エピトープの観点から解析することは、現行の根本的な治療を評価する上でも意義があると思われる。

本研究では、スギ花粉アレルゲンエキスをを用いた免疫療法でスギ・ヒノキ花粉症に対して十分な効果が得られるかどうかを解析するとともに、スギとヒノキ花粉アレルゲンの T 細胞エピトープ部位を詳細に解析し、スギ・ヒノキ花粉症に対する免疫療法に関してヒノキアレルゲンの必要性について検討する。ヒノキ特異的エピトープの重要性が確認されたなら、これまでのペプチド療法にこ

れを含めた新たなペプチド療法剤を作製する。

### B. 研究方法

1) マウスを用いた検討：B10.S マウスに精製 Cry j 1 を週 4 回、2 週間経口投与後、Cry j 1 あるいは Cha o 1 で 2 週間点鼻感作した。感作終了 1 週間後、Cry j 1 と Cha o 1 に対する T 細胞の反応性および血清抗体価を測定した。Cry j 1 あるいは Cha o 1 特異的 T 細胞エピトープ部位の同定は、B10.S、BALB/c および C57BL/6 マウスにそれぞれのアレルゲンで感作した後に、マウス脾細胞の部分合成ペプチドに対する増殖反応性を検討することにより解析した。

2) ヒトでの検討：Cry j 1 のヒト主要 T 細胞エピトープに相当する Cha o 1 のペプチド部分を用いて、花粉症患者末梢血単核球の反応性を解析し、ヒノキ花粉アレルゲン Cha o 1 特異的 T 細胞エピトープ部位が存在するか検討した。なお、この解析には分担研究者の岡本・藤村氏から供与された凍結患者リンパ球を用いた。

### C. 研究結果

B10.S マウスを用いた系では、Cry j 1 の感作により誘導された Cry j 1 に対する免疫応答は Cry j 1 の経口投与により T 細胞と B 細胞レベルで抑制された。さらに、Cry j 1 の感作により誘導された Cha o 1 に対する交叉反応性も Cry j 1 の経口投与により抑制されることが判明した (図 1)。これに対して、Cha o 1 の感作により誘導された Cha o 1 に対する免疫応答は、抑制できなかった。この結果から Cha o 1 特異的 T 細胞エピトープの

存在が示唆されたため、Cry j 1 あるいは Cha o 1 で感作したマウスを作成し、それぞれのアレルゲンの部分合成ペプチドに対する増殖反応性から T 細胞エピトープ部位を同定した。その結果、B10.S マウスでは共通エピトープ部位は p211-230、Cry j 1 特異的的部位は 3 ヶ所 (p81-100, p111-130, p311-330)、Cha o 1 特異的的部位は 2 ヶ所 (p68-82, p278-292) 存在することが判明した。BALB/c マウスでは、Cry j 1 特異的 T 細胞エピトープ部位は一ヶ所 p271-290、Cha o 1 特異的的部位は 2 ヶ所 (p63-77, p136-148) であった。なお、交叉反応がないために共通エピトープ部位は認められなかった。C57BL/6 は Cry j 1 に対しては無応答性であるが、Cha o 1 には反応する。この Cha o 1 特異的 T 細胞エピトープ部位は p311-325 一ヶ所であった。この結果から、Cry j 1 特異的あるいは Cha o 1 特異的マウス T 細胞エピトープの存在が明らかになった (図 2)。

図 1 A. Cry j 1 の経口免疫寛容  
- T 細胞レベル -

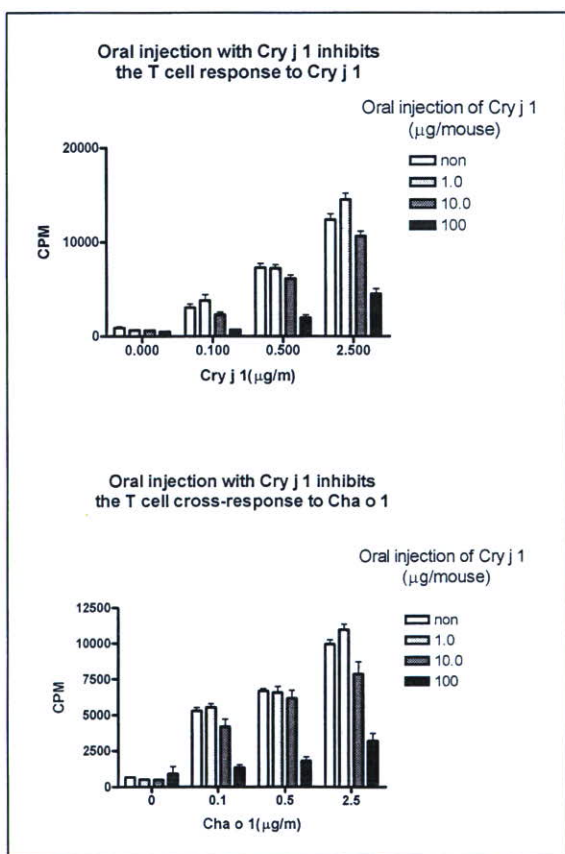


図 1 B. - 抗体レベル -

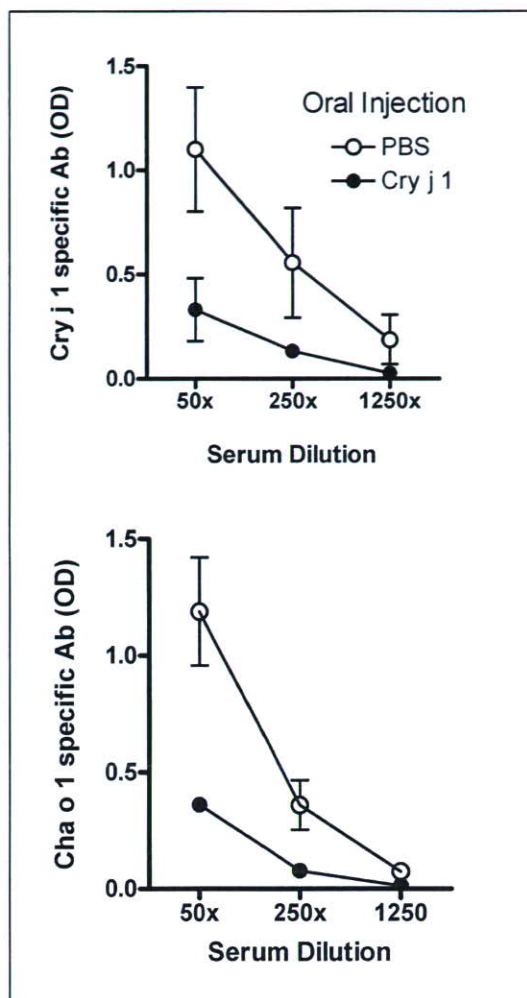


図 2 A. T cell epitope on Cry j 1 and Cha o 1 of BALB/c mice

```

61                               80
GATRERSLWIFSKNLIKL: Cha o 1
**** * ***** * ****

GATRDRPLWIIIFSGNMNIKL: Cry j 1

131                               150
SGNVLISEASGVVPVHAQDG: Cha o 1
***** * ** *** ***

LGNVLINESFGVEPVHPQDG: Cry j 1

271                               290
PNDSDKKEVTRRVGCEPST: Cry j 1
** * ** * ** * ** *

PNESYKKQVTIRIGCKTSSS: Cha o 1

```

図2B. T cell epitope on Cry j 1 and Cha o 1 of B10. S mice

81	100
<u>NMPLYIAGNKTIIDGRGAEVH</u> : Cha o 1	
** ***** ** * *** *	
<u>KMPMYIAGYKTFDGRGAQVY</u> : Cry j 1	
111	130
<u>RTVSHVILHGLNIHGCNTSV</u> : Cha o 1	
** ** *** ** ***	
<u>KRVSNVIIHGLHLYGCSTSV</u> : Cry j 1	
211	230
<u>KSMKVTVAFNQFGPNAGQRM</u> : Cha o 1	
*****	
<u>KSMKVTVAFNQFGPNCGQRM</u> : Cry j 1	
278	292
<u>EVTRRVGCESPSTCA</u> : Cha o 1	
** * ** * *	
<u>QVTIRIGCKTSSSCS</u> : Cry j 1	
311	330
<u>SSGKNEGTTNIYNNNEAFKVE</u> : Cha o 1	
**** ** *** *** **	
<u>SSGKYEGGNIYTKKEAFNVE</u> : Cry j 1	

図2C. T cell epitope on Cha o 1 of C57BL/6 mice

311	325
<u>SSGKNEGTTNIYNNNE</u> : Cha o 1	
**** ** *** *	
<u>SSGKYEGGNIYTKKE</u> : Cry j 1	

次に、4名の花粉症患者末梢血単核球を用いて Cry j 1 のヒト主要 T 細胞エピトープに相当する Cha o 1 のペプチド部分に対する反応性から、Cha o 1 特異的 T 細胞エピトープ部位が存在するか検討した。PBMC の増殖反応性は弱い、Cry j 1 のヒト主要 T 細胞エピトープ部位に相当する中で Cha o 1 特異的エピトープ部位は Cry j 1 の p91-110, p231-250, p311-330 に相当する部位であった。これに対して Cry j 1 の p151-170, p161-180 に相当する Cha o 1 特異的エピトープ部位は現在のところ認められていない。なお、p211-230 は共通 T 細胞エピトープ部位であった。

D. 考察

B10.S マウスを用いた解析から、スギ花粉アレルゲン Cry j 1 の経口投与により、Cry j 1 に対する免疫応答性ばかりでなく、Cry j 1 で誘導された Cha o 1 に対する交叉免疫応答性も抑制される事が判明した。これは、スギ花粉アレルゲン Cry j 1 の主要な T 細胞エピトープ部位が p22 の共通 T 細胞エピトープ部位である患者は、スギ花粉エキスをを用いた免疫療法によりヒノキ花粉アレルゲン Cha o 1 に対する交叉反応も抑制されることを示唆している。しかし、Cha o 1 で誘導された免疫応答は、Cha o 1 特異的 T 細胞エピトープ部位が存在するために Cry j 1 の経口投与により抑えられない。この結果は、ヒトにおいても Cha o 1 特異的 T 細胞エピトープをもつ患者ではスギ花粉エキスをを用いた免疫療法では、ヒノキ花粉アレルゲン Cha o 1 に対する反応は抑制できないことを示唆している。さらに、3系統のマウスで Cha o 1 特異的 T 細胞エピトープを明らかにしたことは、免疫療法におけるヒノキアレルゲンの有用性を解明する上で意味があると思われる。

実際、スギ花粉症患者 PBMC の反応性から T 細胞エピトープ部位を解析すると、共通エピトープ部位はこれまでに判明している p211-230 の 1ヶ所しか認められなかった。昨年 Cry j 1 の主要な T 細胞エピトープとそれに相当する Cha o 1 の配列の相同性の比較から、特異的 T 細胞エピトープの存在を 2ヶ所存在することを推測したが、本研究では p91-110, p231-250, p311-330 ではそれぞれ特異的 T 細胞エピトープが存在すること、p151-170, p161-180 は Cry j 1 特異的 T 細胞エ

トープになるが、Cha o 1特異的エピトープにならないことが示唆された。今回の結果は、4名の患者での解析であること、花粉アレルギーに対する反応性が低い状況の中での解析であること、さらにはCry j 1の主要なT細胞エピトープとそれに相当するCha o 1の配列に対する反応性からの解析であること等から、限られた情報しか得られていないと思われる。

そこで次年度の研究では、解析数を増やし、Cha o 1の部分合成ペプチドを用いた網羅的な解析により、マウスで得られたように全く異なった部位にCha o 1特異的エピトープ部位の存在を明らかにできると思われる。さらに、この解析を踏まえて免疫療法施行患者の評価を考慮することにより、免疫療法におけるヒノキ花粉アレルギーの必要性が明らかになるものと思われる。

#### E. 結論

マウスの解析から、スギ花粉アレルギー Cry j 1の経口免疫寛容では、抑制できないヒノキ花粉アレルギー特異的T細胞エピトープ部位が存在することが判明した。スギ花粉症患者においても、ヒノキ花粉アレルギー特異的T細胞エピトープ部位が存在することを明らかにした。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Kazumi Yamada, Nobutake Akiyama, Shuichi Yamada, Hiromitsu Tanaka, Saburo Saito, Masahiro Hiraoka, Shinae Kizaka-Kondoh. *Taip2* is a novel cell death-related gene expressed in the brain during development (BBRC 2008 in press).

2) Keiko Wakahara, Hiroyuki Tanaka, Go Takahashi, Mayumi Tamari, Reishi Nasu, Tatsuyuki Toyohara, Hirohisa Takano, Saburo Saito, Naoki Inagaki, Kaoru Shimokata, Hiroichi Nagai. Repeated instillations of *Dermatophagoides farinae* into the airways can induce Th2-dependent airway hyperresponsiveness, eosinophilia and remodeling in mice -Effect of intratracheal treatment of fluticasone propionate. *Eur J Pharmacol* 578: 87-96

2008.

3) Daitaro Kurosaka, Jun Yasuda, Hiroko Ikeshima-Kataoka, Yoshinori Ozawa, Ken Yoshida, Chiho Yasuda, Isamu Kingetsu, Saburo Saito, Akio Yamada. Decreased numbers of signal-joint t cell receptor excision circle-containing CD4+ and CD8+ cells in systemic lupus erythematosus patients. *Mod Rheumatol* 17: 296-300, 2007.

##### 2. 学会発表

1) Saito Saburo, Akiyama Nobutake, Ohno Yuji, Ikeshima K Hiroko. IgE responses triggered by IL-31. *EAACI 62 Supplement* 83: 457, June, 2007. Goteborg, Sweden.

2) 斎藤三郎、秋山暢丈. IL-31 過剰発現マウスの皮膚症状と血清 IgE レベル. 第 57 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 2007 年 9 月.

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

特になし



厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患・治療研究事業）  
分担研究報告書

舌下免疫療法における臨床試験および作用機序の解析に関する研究

主任研究者 阪口雅弘 麻布大学獣医学部獣医学科微生物学第1研究室 教授  
分担研究者 岡本美孝 千葉大学大学院医学研究院耳鼻咽喉・頭頸部腫瘍学 教授  
中山俊憲 千葉大学大学院医学研究院免疫発生学 教授  
大久保公裕 日本医科大学耳鼻咽喉科 准教授  
安枝 浩 国立病院機構相模原病院臨床研究センター 室長  
斎藤三郎 東京慈恵会医科大学 DNA 医学研究所 准教授  
研究協力者 堀口茂俊 千葉大学大学院医学研究院耳鼻咽喉・頭頸部腫瘍学 講師  
大川 徹 千葉大学大学院医学研究院耳鼻咽喉・頭頸部腫瘍学 助教  
茶園英明 千葉大学大学院医学研究院耳鼻咽喉・頭頸部外科 助教  
藤村孝志 千葉大学大学院医学研究院耳鼻咽喉・頭頸部腫瘍学 産学官連携研究員

研究要旨 舌下免疫療法は、皮下注射型減感作療法に替わるより安全な根治療法として注目されているが、その治療効果および治療機序については明らかになっていない。本研究では2重盲検比較臨床試験により舌下免疫療法の治療効果を評価すると共に、患者末梢血より分離精製した mRNA をもちいたマイクロアレイ解析により、舌下免疫療法治療バイオマーカーの検索、ならびに末梢血リンパ球をもちいた培養実験により治療機序の解明を目的とした。今回、マイクロアレイ解析の前段階として、発現遺伝子のクラスター解析、ならびに、末梢血リンパ球のサイトカイン産生、増殖能を解析した。

A. 研究目的

減感作療法はアレルギー疾患における唯一有効な根治療法であるが、アナフィラキシー等の重篤な副反応が生じる危険性があるために、一般には普及していない。

近年、副作用の少ない免疫療法として口腔内舌下にアレルゲンエキスを投与する舌下免疫療法が開発され、より安全な根治療法として欧米では臨床応用されつつある。本研究では高濃度及び低濃度のアレルゲンエキスを投与することで、2年間の二重盲検比較臨床試験により舌下免疫療法の有効

性および安全性を明らかとする。また、舌下免疫療法により変動する治療バイオマーカーの探索並びに治療機序の解析を目的とする。

B. 研究方法

RAST 値が2以上であるスギ花粉症患者を高濃度投与群(8000 JAU/月)、低濃度投与群(800 JAU/月)、偽薬群に分け、トリイ社の減感作用抗原エキスを舌下投与し、二重盲検比較臨床試験を2年間行い治療効果の違いを明らかとする。治療効果はスギ花粉

飛散期の花粉症症状・薬剤投与量・QOL について群間比較を行い臨床効果と副作用の差を評価する。また、舌下免疫療法の治療バイオマーカー探索のため、1年間のオープン試験を行う。オープン試験では抗原エキスを投与した群と無投与の群より、花粉飛散期前後に末梢血単核球 (PBMC) を分離し、スギ花粉アレルゲン刺激により変動するサイトカイン、細胞表面発現分子、増殖能の変化を解析する。また、血清よりスギ花粉特異的抗体価の変動を解析する。

### C. 研究結果

現在、二重盲検比較臨床試験として高濃度投与群、低濃度投与群、偽薬群の減感作用抗原エキスの投与を行っている。現在までに投与による重大な有害事象は認められていない。2008年の花粉飛散終了後に、2007年及び2008年の花粉飛散期の花粉症臨床症状・薬剤投与量・QOLの解析及び群間比較を行う予定である。

オープン試験の実薬投与群および無投与群間で花粉飛散期前後のスギ花粉特異的 IgE、IgG4 抗体価に有意な変動の差は認められなかった。オープン試験により採取した PBMC をスギ花粉アレルゲンにより *in vitro* にて刺激し、そのサイトカイン産生ならびに増殖能を解析した。スギ抗原刺激下において、PBMC の増殖能に実薬群・無投与群の間で有意な差は認められなかった。また、培養上清中の IL5、IL13 産生は実薬群で無投与群に比べ低い傾向が認められたが、有意な差は認められなかった。一方、IL2 産生に関しては花粉飛散後において実薬投与群で無投与群に比べ有意に低値であった (図 1)。

末梢血単核球より分離した CD4 陽性細胞のマイクロアレイによるクラスター解析の結果、スギ花粉抗原 (Cry j 1) 刺激した時の遺伝子変動は無投与群に比べ実薬群で、花粉飛散以前、花粉飛散以降でより明確なクラスターを形成する傾向にあった (図 2)。このことは、無投与群に比べ実薬群において、より多くの転写産物が花粉飛散後に共通して発現亢進もしくは抑制されていることを示唆している。

### D. 考察

オープン試験において、花粉飛散前後で抗体価の有意な変動が見られなかった。このことは、2007年の一日当たりの花粉飛散量が例年に比べ比較的少なかったことに起因しているのかもしれない。また、スギ花粉アレルゲンで刺激した時の PBMC の増殖能が比較的低値であったことも、同様の理由によると考えられた。

実薬群において、培養上清中の IL2 産生が有意に低下しており、また、IL5、IL13 産生が低い傾向にあったことから、舌下免疫治療によりアナジーが誘導されている可能性が示唆された。

二重盲検比較試験終了後に、実薬・偽薬群間での症状の改善、サイトカイン産生、PBMC の増殖能について大規模に検討する予定である。

### E. 結論

実薬群において IL2 産生が有意に低下しており、また、IL5、IL13 産生が低い傾向にあったことから、舌下免疫治療によりアナジーが誘導されている可能性が示唆された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Fujimura, T., Futamura, N., Midoro-Horiuti, T., Togawa, A., Goldblum, RM., Yasueda, H., Saito, A., Shinohara, K., Masuda, K., Kurata, K. and Sakaguchi, M: Isolation and characterization of native Cry j 3 from Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen. *Allergy* 62, 547-553, 2007.
- 2) Delaunay, J., Sasajima, H., Yokota, M., Okamoto, Y. Side-by-side comparison of automatic pollen counters for use in pollen information systems, *Ann Allergy Asth Immunol* 98, 553-558, 2007.
- 3) Yamamoto, H., Okamoto, Y., Horiguchi, S., Kunii, N., Yonekura, S., Nakayama, T.: Detection of natural killer T cells in the sinus mucosa from asthmatics with chronic sinusitis. *Allergy* 62, 1451-1455, 2007.
- 4) Horiguchi S, Tanaka Y, Uchida T, Chazono H, Okawa T, Okamoto Y.: Seasonal changes in antigen-specific Th clone sizes in patients with Japanese cedar pollinosis: A 2-year study. *Clin Exp Allergy* 38, 408-442, 2008.
- 5) Horiguchi S, Okamoto Y, Yonekura S, Okawa T, Yamamoto H, Kunii N, Sakurai D, Fujimura T, Nakazawa K, Yasueda H.: A randomized controlled trial of sublingual immunotherapy for Japanese cedar pollinosis. *Int Arch Allergy Immunol* 146, 76-84, 2008.
- 7) Iwamura, C., and Nakayama, T.: Role of a-galactosylceramide-activated Va14 natural killer T cells in the regulation of allergic diseases. *Allergol Int* 56, 1-6, 2007.
- 9) Kimura, Y. M., Iwamura, C., Suzuki, A.,

Miki, T., Hasegawa, A., Sugaya, K., Yamashita, M., Ishii, S., and Nakayama, T.: Schnurri-2 controls memory Th1 and Th2 cell numbers in vivo. *J Immunol* 178, 4926-4936, 2007.

6) Iwamura, C., Kimura, Y. M., Shinoda, K., Endo, Y., Hasegawa, A., Yamashita, M., and Nakayama, T.: Schnurri-2 regulates Th2-dependent airway inflammation and airway hyperresponsiveness. *Int Immunol* 19, 755-762, 2007.

7) Yamashita, M., Onodera, A., and Nakayama, T.: Immune mechanisms of allergic airway diseases: Regulation by transcription factors. *Crit Rev Immunol* 27, 536-546, 2007.

8) Hashiguchi K, Tang H, Fujita T, Tsubaki S, Fujita M, Suematsu K, Gotoh M, Okubo K.: Preliminary study on Japanese cedar pollinosis in an artificial exposure chamber (OHIO chamber). *Allergol Int* 56, 125-130, 2007.

9) Nagakura, T., Ogino, S., Okubo, K., Sato, N., Takahashi, M., Ishikawa, T.: Omalizumab is more effective than suplatast tosilate in the treatment of Japanese cedar pollen-induced seasonal allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy* 38, 329-337, 2007.

### 2. 学会発表

1) 岩村千秋、鈴木茜、篠田健太、太刀川彩保子、中山俊憲: 転写因子 Schnurri-2 によるアレルギー-気道炎症制御 / Schnurri-2 regulates Th2-dependent airway inflammation and airway hyperresponsiveness. 第37回日本免疫学会総会・学術集会 (2007年11月20日、品川)

2) Yamamoto, H., Okamoto, Y., Horiguchi, S., Kunii, N., and Nakayama, T.: 慢性副鼻腔炎の

- 病態形成に及ぼす喘息合併の意義-NKT 細胞とサイトカイン産生の検討から - /Detection of natural killer T cells in the sinus mucosa from asthmatics with chronic sinusitis. 第 37 回日本免疫学会総会・学術集会 (2007 年 11 月 21 日、品川)
- 3) 鈴木茜、木村元子、岩村千秋、Hossain, M. B.、北島雅之、遠藤裕介、堀内周、山下政克、中山俊憲:Schnurri-2 によるメモリー-Th1/Th2 細胞形成調節/Schnurri-2 controls memory Th1 and Th2 cell numbers in vivo. 第 37 回日本免疫学会総会・学術集会 (2007 年 11 月 21 日、品川)
- 4) Yamashita, M., Kuwahara, M., Shinnakasu, R., Hosokawa, H., and Nakayama, T.: Bmi1 は Noxa 遺伝子の発現抑制を介してメモリー-Th 細胞の生存を維持する /Bmi1 regulates memory Th cell survival via repression of the Noxa gene. 第 37 回日本免疫学会総会・学術集会 (2007 年 11 月 22 日、品川)
- 5) Hoshino, A., Nagao, T., Miura, N., Ohno, N., Nakayama, T., and Suzuki, K.: MPO-ANCA induces IL-17A production by activated neutrophils of murine systemic vasculitis. 第 37 回日本免疫学会総会・学術集会 (2007 年 11 月 22 日、品川)
- 6) Hosokawa, H., Yamashita, M., Koseki, H., van Lohuizen, M., and Nakayama, T.: Regulation of Th2 cell development by Polycomb group gene bmi-1 through the stabilization of GATA3. Chromatin Structure & Function, 2007 Nov 27, Antigua.
- 7) 岸川禮子, 齋藤明美, 児塔栄子, 轡田和子, 高島美奈子, 石井豊太, 安枝 浩, 下田照文, 庄司俊輔, 秋山一男, 西間三馨:Burkard sampler による空中花粉調査— Durham sampler との比較— . 第 57 回日本アレルギー学会秋季学術大会 (平成 19 年 11 月、東京)
- 8) Fujiwara, T., Futamura, N., Shinohara, K., Midoro-Horiuti, T., Goldblum, G.M., Yasueda, H., and Sakaguchi, M.: The characterization of native thaumatin-like allergen named Cry J 3 from Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen. World Allergy Congress 2007, December 2, 2007.
- 9) 山下政克, 桑原誠, 新中須亮, 細川裕之, 中山俊憲:Bmi1 は Noxa 遺伝子の発現調節を介してメモリー-CD4 T 細胞の生存を制御する. 第 30 回日本分子生物学会年会 第 80 回日本生化学学会大会 (2007 年 12 月 11 日、横浜)
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

図 1. 花粉飛散前後に採取した PBMC の培養上清中の IL2 濃度

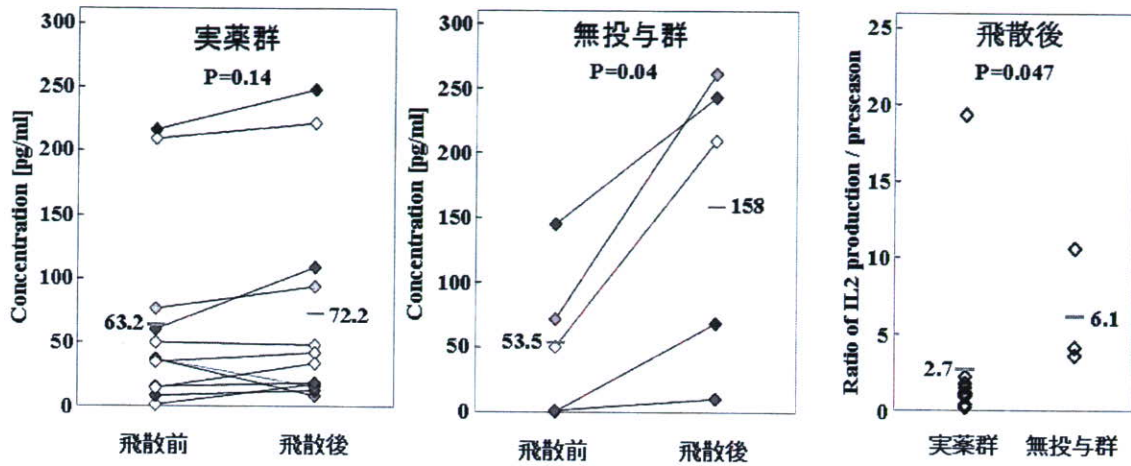
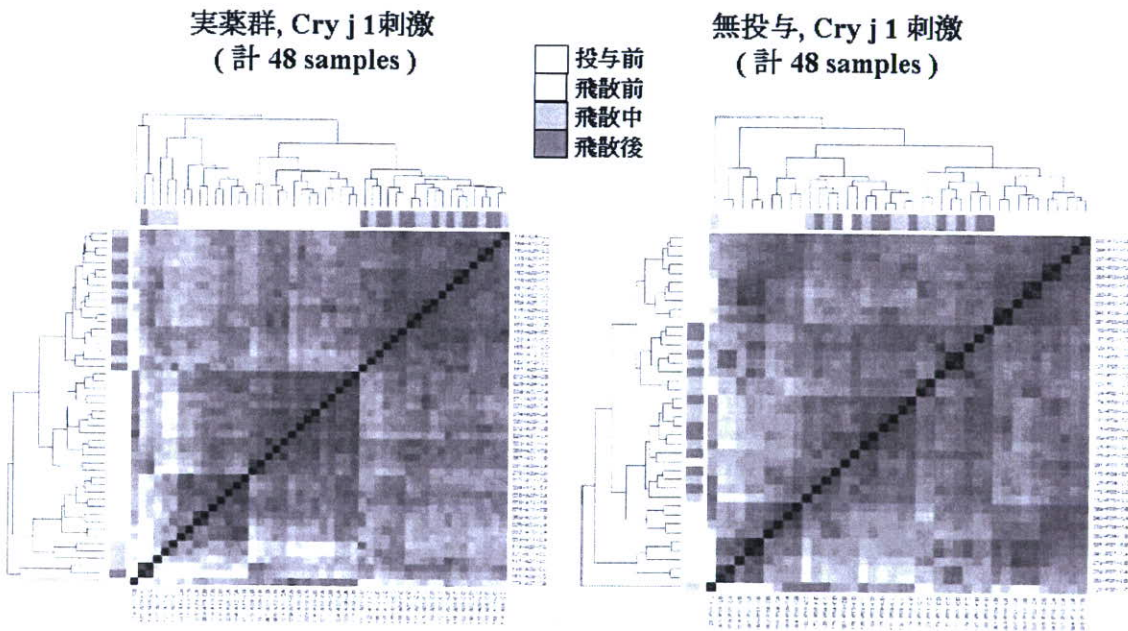


図 2. CD4 T 細胞のヒートマップ (クラスター解析)



ヒートマップ中、□→■に従い、相関係数が高いことを示している。

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年	番号
Fujimura T, Futamura N, Midoro-Horiuti T, Togawa A., Goldblum RM, Yasueda H, Saito A, Shinohara K, Masuda K, Kurata K, Sakaguchi M.	Isolation and characterization of native Cry j 3 from Japanese cedar ( <i>Cryptomeria japonica</i> ) pollen.	Allergy	62	547-553	2007	1
Yoshitomi T, Nakagami Y, Hirahara K, Taniguchi Y, Sakaguchi M, Yamashita M.	Intraoral administration of a T-cell epitope peptide induces immunological tolerance in Cry j 2-sensitized mice.	J Pept Sci	13	499-503	2007	2
Takahashi Y, Aoyama M, Yoshitake M, Abe E, Ohta, N, Sakaguchi M.	Relationship between airborne Cry j 1 and the onset time of the symptoms of Japanese cedar pollinosis patients.	Allergol Int	56	277-283	2007	3
Ichikawa S, Fujii R, Fujiwara D, Komiyama Y, Kaisyo T, Sakaguchi M, Konishi Y.	MyD88 but not TLR2, 4 or 9 is essential for IL-12 induction by lactic acid bacteria.	Biosci Biotechnol Biochem	71	13026-3032	2007	4
Ohmori K, Masuda K, DeBoer DJ, Sakaguchi M, Tsujimoto H.	Immunoblot analysis for IgE-reactive components of fetal calf serum in dogs that developed allergic reactions after non-rabies vaccination.	Vet Immunol Immunopathol	115	166-171	2007	5
Ohmori K, Masuda K., Kawarai S, Yasuda N, Sakaguchi M, Tsujimoto H.	Identification of bovine serum albumin as an IgE reactive beef component in a dog with food hypersensitivity against beef.	J Vet Med Sci	69	865-867	2007	6
Onishi N, Kawamoto S, Suzuki H, Santo H, Aki T, Shigeta S, Hashimoto K, Hide M, Ono K.	Dietary pulverized konjac glucomannan suppresses scratching behavior and skin inflammatory immune response in NC/Nga	Int Arch Allergy Immunol	114	95-104	2007	7
Onishi N, Kawamoto S, Ueda K, Yamanaka Y, Katayama A, Suzuki H, Aki T, Hashimoto K, Hide M, Ono K.	Dietary pulverized konjac glucomannan prevents the development of allergic rhinitis-like symptoms and IgE response in mice.	Biosci Biotechnol Biochem	71	2551-2556	2007	8
小埜和久	植物アレルゲンのプロテオーム解析と免疫学的治療支援システムの展望	日本ラテックスアレルギー研究会誌	11	10-16	2007	9
Ogawa T, Takai T, Kato T, Kikuchi T, Niyonsaba F, Ikeda S, Okumura K, Ogawa H	Upregulation of release of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor from keratinocytes stimulated with cysteine protease activity of recombinant major mite allergens, Der f 1 and Der p 1	Int Arch Allergy Immunol	146	27-35	2008	10
Gunawan H, Takai T, Ikeda S, Okumura K, Ogawa H	Protease activity of allergenic pollen of cedar, cypress, juniper, birch and ragweed	Allergol Int	57	83-91	2008	11
Wakahara K, Tanaka H, Takahashi G, Tamari M, Nasu R, Toyohara T, Takano H, Saito S, Inagaki N, Shimokata K, Nagai H.	Repeated instillations of <i>Dermatophagoides farinae</i> into the airways can induce Th2-dependent airway hyperresponsiveness, eosinophilia and remodeling in mice: effect of intratracheal treatment of fluticasone	Eur J Pharmacol	578	87-96	2008	12

## 雑誌

Naito S, Maeyama J, Mizukami T, Takahashi M, Hamaguchi I, Yamaguchi K.	Transcutaneous immunization by merely prolonging the duration of antigen presence on the skin of mice induces a potent antigen-specific antibody response even in the absence of an adjuvant.	Vaccine	25	8762-8770	2007	13
Yamamoto H, Okamoto Y, Horiguchi S, Kunii N, Yonekura S, Nakayama T.	Detection of natural killer T cells in the sinus mucosa from asthmatics with chronic sinusitis	Allergy	62	1451-1455	2007	14
岡本美孝	ワクチン療法	総合臨床	56	1945-1949	2007	15
鈴木洋一, 真下陽一, 井上寛規, 船水真紀子, 羽田明, 下条直樹, 河野陽一, 岡本美孝	小学生のヨーグルト・乳酸菌飲料摂取とアレルギー感作・アレルギー疾患との関係	アレルギー	57	37-45	2008	16
Iwamura C, Nakayama T.	Role of $\alpha$ -galactosylceramide-activated Va14 natural killer T cells in the regulation of allergic diseases.	Allergol Int	56	1-6	2007	17
Nakamatsu M, Yamamoto N, Hatta M, Nakasone C, Kinjo T, Miyagi K, Uezu K, Nakamura K, Nakayama T, Taniguchi M,	Role of interferon-gamma in Va14+ natural killer T cell-mediated host defense against Streptococcus pneumoniae infection in murine lungs.	Microbes Infect	9	364-374	2007	18
Iwamura C, Kimura MY, Shinoda K, Endo Y, Hasegawa A, Yamashita M, Nakayama T.	Schnurri-2 regulates Th2-dependent airway inflammation and airway hyperresponsiveness.	Int Immunol	19	755-762	2007	19
Masuda K, Kakugawa K, Nakayama T, Minato N, Katsura Y, Kawamoto H.	T cell lineage determination precedes the initiation of TCR-beta gene rearrangement.	J Immunol	179	3699-3706	2007	20
Yamamoto H, Okamoto Y, Horiguchi S, Kunii N, Yonekura S, Nakayama T.	Detection of natural killer T cells in the sinus mucosa from asthmatics with chronic sinusitis.	Allergy	62	1451-1455	2007	21
Yamashita M, Onodera A, Nakayama T.	Immune mechanisms of allergic airway diseases: Regulation by transcription factors.	Crit Rev Immunol	27	539-546	2007	22
Uchida T, Horiguchi S, Tanaka Y, Yamamoto H, Kunii N, Motohashi S, Taniguchi M, Nakayama T, Okamoto Y.	Phase I study of $\alpha$ -galactosylceramide-pulsed antigen presenting cells administration to the nasal submucosa in unresectable or recurrent head and neck cancer.	Cancer Immunol. Immunother	57	337-345	2008	23
Hashiguchi K, Tang H, Fujita T, Tsubaki S, Fujita M, Suematsu K, Gotoh M, Okubo K	Preliminary study on Japanese cedar pollinosis in an artificial exposure chamber (OHIO chamber).	Allergol Int	56	125-130	2007	24
Nagakura T, Ogino S, Okubo K, Sato N, Takahashi M, Ishikawa T.	Omalizumab is more effective than suplatast tosilate in the treatment of Japanese cedar pollen-induced seasonal allergic rhinitis.	Clin Exp Allergy	38	329-337	2007	25
福田陽子, 安枝浩, 齋藤明美, 近藤禎二	花粉中のCry j 2抽出法の改良及びCry j 2含量におけるスギ個体間変異の検討	アレルギー	56	1262-1269	2007	26